

ЦИТОГЕНЕТИЧНІ ОСОБЛИВОСТІ КАЛЮСНИХ КУЛЬТУР ТРИТИКАЛЕ ОЗИМОГО ЗА ДІЇ СОЛЬОВОГО СТРЕСУ

CYTOGENETIC CHARACTERISTICS OF WINTER TRITICALE CALLUS CULTURES EXPOSED TO SALT STRESS

Пикало С.В.¹, Дубровна О.В.²
Pycalo S.V.¹, Dubrovna O.V.²

¹Миронівський інститут пшениці імені В.М. Ремесла НААН України

²Інститут фізіології рослин і генетики НАН України

¹V.M. Remeslo Myronivka Institute of Wheat Crafts of NAAS of Ukraine

²Institute of Plant Physiology and Genetics NAS of Ukraine

e-mail: pykserg@ukr.net

Установлен цитогенетический эффект действия хлорида натрия на клетки каллусных культур тритикале в процессе отбора устойчивых к солевому стрессу форм. Сублетальная концентрация стрессового фактора вызывала кластогенный эффект и турбагенные нарушения в клетках каллусов. Большинство хромосомных aberrаций были представлены в виде хроматидных мостов и фрагментов, а среди нарушений клеточного деления наиболее часто встречались мультиполярные митозы. Анализ генетической структуры клеточных популяций на протяжении длительного культивирования при сублетальной концентрации гипохлорида натрия показал достоверное увеличение анеуплоидии и частоты сегрегации геномов, что проявляется в увеличении популяций клеток со сниженным относительно модального числом хромосом.

The cytogenetic effect of sodium chloride on cultured triticale callus cells was established during selection of salt stress resistant forms. Sublethal concentration of the stress factor exerted clastogenic and turbogenic effects in callus cells. Most of chromosomal aberrations were chromatid bridges and fragments, and multipolar mitoses were the most frequent disorder of cell division. Analysis of the genetic structure of cell populations over long-term culturing with sublethal concentration of sodium hypochloride showed a significant increase in aneuploidy and genome segregation frequency, which was manifested as an increase in cell populations with reduced chromosome numbers related to the modal chromosome number.

Тритикале (*×Triticosecale* Wittmack) – вперше цілеспрямовано й успішно створений людиною міжвидовий гібрид нової зернової культури. Останнім часом тритикале набуває популярності у світі як культура кормового, харчового й технічного напрямів технологічного використання зерна. Протягом онтогенезу рослини даної культури підлягають впливу різних факторів навколишнього середовища, які негативно впливають на їх ріст, розвиток та урожайність. При визначенні механізмів дії даних стресових чинників та природи стійкості рослин потрібно знати про реакцію не лише цілої рослини або органу, але й функціонально різних тканин і клітин. Зважаючи на це, на сьогодні у дослідженні стійкості до різних стресорів досить перспективним є застосування культури ізольованих клітин, оскільки це дає змогу вивчати дію селективних факторів на клітину в строго контрольованих умовах культивування. Даний підхід також надає можливість виключити складні корелятивні взаємовідносини між різними органами і тканинами і, як наслідок, полегшити дослідження самого процесу дії стресового фактора на клітинний метаболізм. Метою даної роботи було вивчення впливу сольового стресу на цитогенетичну структуру клітинних популяцій калюсних культур тритикале озимого з використанням хлориду натрію як стрес-чинника.

Матеріалом досліджень були калюсні культури, отримані із експлантатів верхівки пагона 3-добових стерильних проростків рослин озимого

гексаплоїдного тритикале лінії 38/1296. Для індукції калюсу використовували середовище Мурасіге-Скуга, доповнене 2,4-Д концентрацією 2,0 мг/л. Калюси культивували при 26 °С, освітленні 3-4 клк, відносній вологості повітря 70% і 16-годинному фотоперіоді. В якості стресового чинника використовували хлорид натрію, який додавали до живильного середовища у сублетальній концентрації 1,2 %. Контролем слугували калюсні культури, які вирощували на середовищі без стресового чинника. Аналізували по 100–150 метафазних та анафазних пластинок у кожному варіанті досліду. Цитогенетичний аналіз калюсних культур проводили в період найбільшої митотичної активності на 5–7-му добу культивування в I, III та VI пасажах. Цитологічне вивчення здійснювали, виключаючи передфіксаційний вплив на мітоз, з використанням стандартної методики фіксації (етилловий спирт: оцтова кислота 3:1). Калюси забарвлювали 2 %-м оцетоорсеїном та готували тимчасові препарати за стандартною методикою. Цитогенетичний ефект дії хлориду натрію на культуру тканин тритикале визначали за зміною співвідношення клітин різного рівня плоідності та частотою структурних перебудов хромосом. Генотоксичну дію NaCl виявляли шляхом аналізу частот виникнення різних типів аномалій мітозу у клітинах калюсних культур. Враховувались наступні параметри: відсоток (%) клітин з хроматидними та хромосомними мостами, фрагментами, відставанням хромосом, мультиполярними митозами на стадіях ана- й телофаз.

Достовірність відмінностей між показниками оцінювали за критерієм Стьюдента.

У контролі калюси характеризувалися стабільно-гетерогенною структурою клітинної популяції, де близько 86 % склали гексаплоїдні клітини, при наявності певного пулу (~5 %) анеуплоїдних та незначної кількості клітин іншого рівня плоідності. При перенесенні калюсів на живильні середовища з сублетальною концентрацією NaCl спостерігали значні зміни в структурі клітинних популяцій калюсних культур. Вже в першому пасажі на селективних середовищах з 1,2 % NaCl визначається статистично достовірне збільшення числа анеуплоїдних (~10 %), тетраплоїдних (~7 %) та диплоїдних (~7 %) клітин та незначна кількість клітин іншого рівня плоідності. Аналіз клітин третього пасажу показав, що у дослідних калюсів відбувається подальше збільшення числа анеуплоїдних (~14 %), гаплоїдних (~3 %), диплоїдних (~9 %), триплоїдних (~6 %), тетраплоїдних (~10 %) та пентаплоїдних (~3 %) клітин за рахунок зменшення числа вихідного модального класу 6х. Протягом шостого пасажу відмічали зникнення гаплоїдних та подальше достовірне збільшення кількості диплоїдних, тетраплоїдних та анеуплоїдних клітин.

Наявність у середовищі сублетальної концентрації NaCl призводило до підвищення частоти хромосомних аберацій. В умовах контролю калюсні культури тритикале характеризувалися досить низьким рівнем хромосомних аберацій – близько 5 %. За дії сублетальної дози хлористого натрію вже в першому пасажі на селективному середовищі частота аберацій хромосом збільшилась майже у 4 рази (18 %). Це свідчить, що високі концентрації NaCl мають виражений кластогенний ефект на калюсні культури тритикале. Більшість аберацій виявлена в клітинах у вигляді хроматидних мостів та фрагментів. Були виділені клітини з множинними порушеннями, тобто такі, які несуть одночасно мости та фрагменти. Як відомо, реалізовані пошкодження хромосом виявляються у вигляді фрагментів та мостів в анафазі цього ж клітинного циклу. Значна кількість аберацій у нашому експерименті представлена у вигляді саме хроматидних мостів, що свідчить про збереження у клітинних поколіннях дицентричних хромосом. Протягом третього пасажу у дослідних калюсів кількість клітин з абераціями суттєво не змінилася, проте була вдвічі більшою, ніж у контролі. У шостому пасажі частота хромосомних аберацій достовірно не змінилася, порівняно з третім, проте знизилась порівняно з першим пасажом. Це може бути обумовлено певною адаптацією клітинної популяції до стресових умов.

На селективних середовищах з 1,2 % NaCl протягом першого пасажу частота клітин з аномаліями мітозу, пов'язаними з порушенням веретена поділу, збільшилася до 13 % (проти 3 % у контролі). Отримані результати підтвердили, що сублетальна концентрація хлориду натрію викликає також і турбагенні порушення в клітинах калюсних культур тритикале. Виявлені багатополосні мітози, відсталі хромосоми, клітини з лопатевими ядрами та мікроядрами, а також двоядерні. Варто підкреслити, що серед порушень мітозу більшість склали багатополосні мітози (до 55 %). Відомо, що така аномалія клітинного поділу є проявом сильної антимікротрубочкової дії токсичних сполук. Крім того, за сублетальної концентрації хлориду натрію в першому пасажі зростає кількість клітин з мікроядрами (до 25-30 % від загального числа клітин з турбагенними порушеннями), що є ознакою апоптозу, нестабільності геному та показником значного генотоксичного ефекту дії хлориду натрію на клітини. Слід зазначити, що частка клітин з іншими патологіями мітозу, зокрема полікаріоцитами (клітинами з лопатевими ядрами), була незначною – їх кількість не перевищувала 5 % від загальної кількості клітин з аномаліями поділу. Протягом третього пасажу у дослідних калюсів кількість клітин з порушенням веретена поділу суттєво не змінилася (11 %), проте була вдвічі більшою, ніж у контролі. У шостому пасажі частота таких клітин достовірно не змінилася (8 %) порівняно з третім, проте знизилась порівняно з першим пасажом.

У результаті проведених досліджень нами виявлено цитогенетичний ефект дії хлориду натрію на клітини калюсних культур тритикале у процесі добору стійких до сольового стресу форм. Цитогенетичний аналіз показав високий ступінь гетерогенності та значні відмінності за цитологічними показниками між калюсними культурами, культивованими на селективному і контрольному середовищах. Встановлено, що сублетальна концентрація стресового чинника спричиняє кластогенний ефект та викликає турбагенні порушення в клітинах калюсів. Більшість хромосомних аберацій були представлені у вигляді хроматидних мостів та фрагментів, а серед порушень клітинного поділу найбільш часто зустрічались мультиполярні мітози. Аналіз генетичної структури клітинних популяцій впродовж тривалого культивування за сублетальної концентрації хлориду натрію виявив достовірне збільшення анеуплоїдії та частоти сегрегації генотипів, що проявляється зростанням популяцій клітин із зменшеним відносно модального числом хромосом.